

Andreas Wöhrmann, Institut für Polarökologie

Gefrierschutzglykoproteine bei *Pleuragramma antarcticum*

Viele Fischarten der Polarmeere schützen sich vor dem Gefrieren durch die Synthese von makromolekularen Substanzen. Diese Moleküle sind meistens Proteine oder Glykoproteine (ANANTHANARAYANAN 1989). Die meisten antarktischen Notothenioidei sowie die arktischen und einige nord-boreale Dorschartige (Gadidae) besitzen sogenannte "antifreeze glycopeptides" (AFGP) der gleichen oder fast identischen Struktur. Dabei handelt es sich um Polymere verschiedener Länge des Glykotreptids Alanin-Alanin-Threonin, wobei an jedes Threonin das Disaccharid Galaktose-N-Acetylgalaktosamin gebunden ist. Diese AFGP können das Wachstum von Eiskristallen stark verlangsamen. Sie binden über Wasserstoffbrücken an Wassermoleküle der Eiskristalle oder auch des flüssigen Wassers, und senken damit den Gefrierpunkt der Lösung, nicht aber deren Schmelzpunkt. Eine sogenannte thermale Hysterese kann beobachtet werden (VANDENHEEDE et al. 1972; DEVRIES 1988). Widersprüchliches war von einigen hochantarktischen Notothenioiden bekannt. Von Arten der Gattung *Pogonophryne*, sowie von *Lepidonotothen kempfi* und *Pleuragramma antarcticum* wurde berichtet, daß sie kein AFGP besitzen sollen (HASCHEMEYER & JANNASCH 1983; EASTMAN 1990). Die pelagische Art *P. antarcticum* kommt unter anderem in dem sehr kalten Wasser ($< -2.0^{\circ}\text{C}$) nahe dem Filchner Schelfeis im südöstlichen Weddellmeer vor (HUBOLD et al. 1990), ein Gefrierschutz ist also unbedingt zu fordern. In diesem kleinen Bericht möchte ich die physikalischen und chemischen Eigenschaften des AFGP und eines neuen Glykoproteins beschreiben, die ich erstmalig aus *P. antarcticum* isolieren konnte. Die Gefrierschutzsubstanzen der anderen Arten sollen in der nächsten Ausgabe der *Mitteilungen zur Kieler Polarforschung* behandelt werden.

Für die Untersuchungen wurden 161 *Pleuragramma antarcticum* verschiedener Altersklassen bearbeitet. Die Tiere wurden auf den *Polarstern*-Expeditionen EPOS 3 (1989) und Ant IX/3 (1991) im südöstlichen Weddellmeer gefangen. Es kamen das Grundschnepnetz (GSN) und das benthopelagische Trawl zum Einsatz (WÖHRMANN & ZIMMERMANN 1992). Die Glykoproteine wurden aus dem Ganzfisch, der Leber bzw. dem Blutserum extrahiert und lyophilisiert. Anschließend wurden die Gefrierschutzsubstanzen mit Hilfe der Ionenaustausch- und Affinitäts-Chromatographie, sowie der Reversed-Phase HPLC aufgereinigt. Die Gefrierschutzglykoproteine wurden auf ihre Aminosäurezusammensetzung und -sequenz, ihre Zuckerstruktur, sowie ihre Sekundärstruktur hin untersucht. Die Gefrierpunktniedrigung oder thermale Hysterese wurde mit der *Differential Scanning Calorimetrie* (DSC) bestimmt (WÖHRMANN 1992).

Tabelle 1: Vergleich der physikalischen und chemischen Charakteristika des Antifreeze Glykoprotein (AFGP) und des neuen *Pleuragramma*-Antifreeze Glykoprotein (PAGP)

Aminosäuren (Mol%)	PAGP Serin (70%) Histidin (24%) Arginin (6%)	AFGP Alanin (66%) Threonin (33%)
Kohlenhydratrest gebunden an	Disaccharid GlcNAc-GlcNAc Serin	Disaccharid Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc Threonin
Bindungstyp	O-glykosidisch	O-glykosidisch
Zirkulardichroismus	β -Konformation (α -Helix \approx 17%)	α -Helix
Molekulargewicht	(\approx 70000 Da)	2600 - 33500 Dalton
max. thermale Hysterese	3.4°C	1.2°C

In Tabelle 1 sind die physikalischen und chemischen Charakteristika des AFGP und des neu entdeckten *Pleuragramma*-Antifreeze Glykoprotein (PAGP) aus *Pleuragramma antarcticum* aufgelistet.

Auffällig ist, daß beide Glykoproteine aus nur wenig verschiedenen Aminosäuren aufgebaut sind, und daß jeweils eine Aminosäure dominiert: bei dem PAGP Serin, bei dem AFGP Alanin. Eine Homologie findet

man auch bei der Kohlenhydratstruktur: in beiden Fällen handelt es sich um ein Disaccharid. Allerdings ist bei dem PAGP das Disaccharid GlcNAc-GlcNAc O-glykosidisch an Serin gebunden. Bei dem AFGP dagegen ist das Disaccharid Gal β 1-3GalNAc über das GalNAc an das Threonin gebunden. Völlig verschieden ist die Sekundärstruktur: während es sich bei dem AFGP um eine expandierte - α -Helix handelt, setzt sich das PAGP nach Zirkulardichroismus-Studien zum größten Teil aus dem β -Faltblatt zusammen mit geringen Anteilen- α -Helix ($\approx 17\%$) und ungeordneten Strukturen. Bemerkenswert ist die außerordentlich hohe thermale Hysterese, die das PAGP bewirken kann. Sie liegt mit einem Maximum von 3.4°C im Bereich der thermalen Hysterese der Hämolymphe überwinternder Insekten (z.B. Larve von *Tenebrio molitor* (HANSEN & BAUST 1988)).

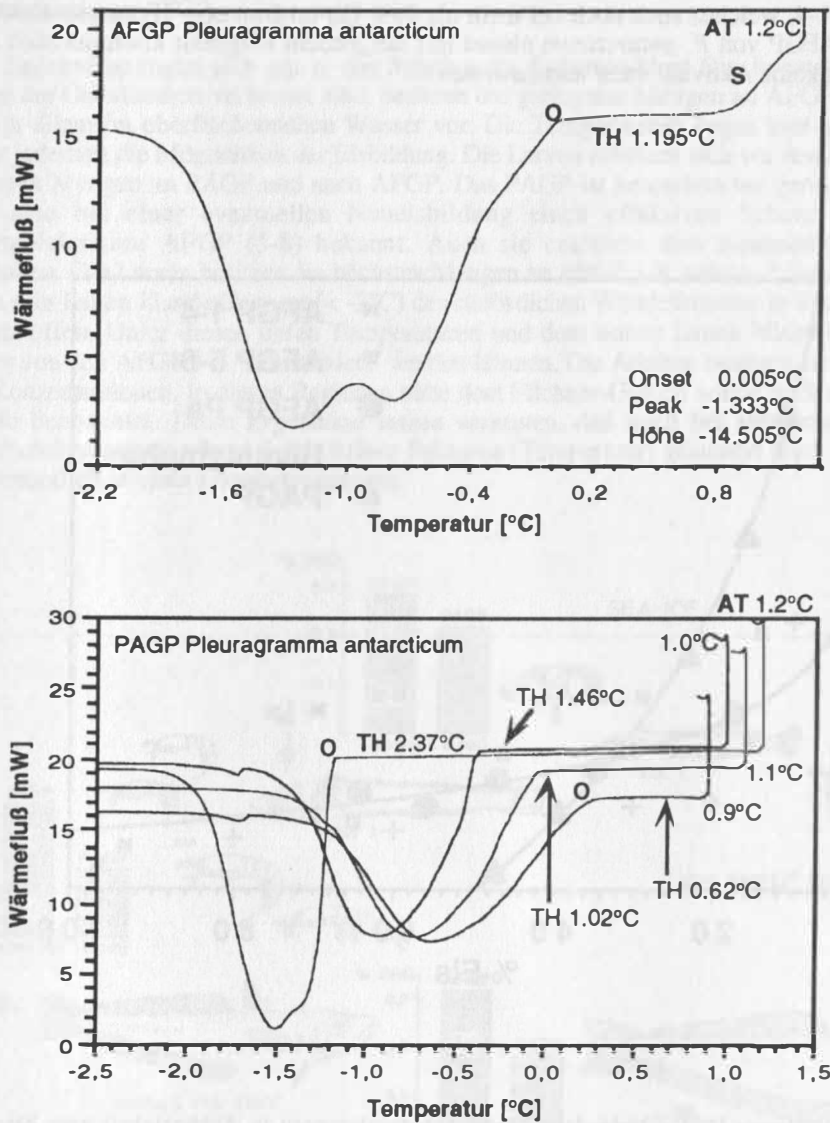


Abbildung 1: Bestimmung der thermalen Hysterese (Gefrierschutzaktivität) mit Hilfe der Differential Scanning Calorimetrie (DSC). Die Probe wird tiefgefroren (-40°C) und auf eine bestimmte Temperatur erwärmt (annealing temperature). Auf dieser Temperatur wird 5 min verweilt und anschließend abgekühlt, die Probe gefriert. Aus der Differenz des Schmelzpunkts (Haltetemperatur AT) und des Gefrierpunkts (Onset O) berechnet sich die thermale Hysterese. O = Onset, S = Schulter, AT = annealing temperature (Haltetemperatur), TH = thermale Hysterese. Die y-Achse gibt den Wärme fluß in mW wieder.

Mit Hilfe einer kalorimetrischen Methode (differential scanning calorimetry) konnte der Gefrierungsprozess beobachtet werden. In der Abbildung 1 (oben) ist die thermale Hysterese des AFGP von *P. antarcticum* dargestellt. Nach dem Abkühlen (AT 1.2°C) ist eine Schulter (S) zu beobachten, die ein langsames Wachstum von Eiskristallen entlang ihrer c-Achse anzeigt. Das AFGP blockiert ein Wachstum in die anderen Achsenrichtungen des Eiskristalls, und damit ein exponentielles Wachstum. Nach einem anschließenden Plateau (kein Eiswachstum) gefriert die Probe bei 0.005°C (Onset O). Die Abbildung unten zeigt die Gefrierpunktserniedrigung des PAGP. Direkt nach dem Abkühlen ist ein Plateau zu beobachten, welches anzeigt, daß in der Probe kein Eiswachstum stattfindet, die Eiskristalle sind demnach völlig blockiert. Erst nach weiterem Abkühlen gefriert die Probe (O), ein sogenanntes Exotherm entsteht. Die Eigenschaften der Gefrierpunktserniedrigung beim PAGP sind vergleichbar mit denen der Hämolymphe von Insekten (Abbildung 2). So ist dieses Glykoprotein besonders wirksam in der Anwesenheit von wenig Eis, ganz im Gegensatz zum hochmolekularen AFGP 1-4, welches auch noch bei mehr als 70% Eis im Blut eine Hysterese auslöst. Die thermale Hysterese des AFGP von *P. antarcticum* nimmt mit steigendem Eisgehalt kontinuierlich ab, bei 70% Eis in der Lösung ist keine Aktivität mehr nachzuweisen.

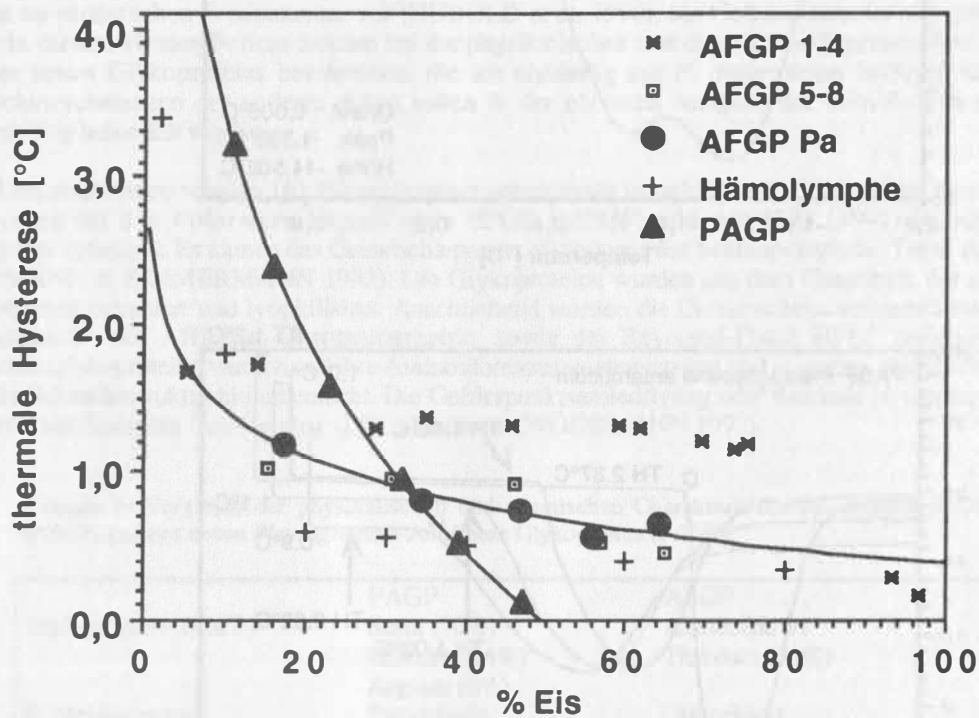


Abbildung 2: Thermale Hysterese [°C] verschiedener Gefrierschutzsubstanzen in Abhängigkeit vom Eisgehalt in der Probe. Die Gefrierschutzaktivität der Hämolymphe von Insekten nimmt mit abnehmendem Eisgehalt exponentiell zu. Dies trifft auch für das neu isolierte Glykoprotein von *Pleuragramma antarcticum* PAGP zu. Im Gegensatz dazu zeigt das AFGP eine fast gleichbleibende Aktivität bis 60 % Eis in der Probe. Die Substanzen sind: AFGP 1-4 aus *Dissostichus mawsoni* (20 mg/ml; *), AFGP 5-8 aus *D. mawsoni* (20 mg/ml; □), AFGP aus *Pleuragramma antarcticum* (20 mg/ml; ○), Hämolymphe aus der Larve von *Tenebrio molitor* (+), PAGP aus *P. antarcticum* (50 mg/ml; Δ).

Bislang ließen Untersuchungen am AFGP vermuten, daß die Notothenioidei ihren Gefrierschutz kontinuierlich über das gesamte Jahr produzieren. So besitzt z.B. die cryopelagische Art *Pagothenia borchgrevinki* gleichbleibend hohe AFGP-Konzentrationen. Arktische Arten dagegen synthetisieren AFGP

nur nach Bedarf, gesteuert über die Wassertemperatur und die Tageslänge (Lichtintensität). In Abbildung 3 ist der Lebenszyklus von *Pleuragramma antarcticum* schematisch dargestellt (aus HUBOLD 1985; HANSEN & BAUST 1988). In dieses Schema wurden die Konzentrationen (% Frischgewicht, FRG) an AFGP und PAGP eingefügt. Es wurden Larven, juvenile und adulte Tiere getrennt untersucht. Die Ergebnisse zeigen, daß die Larven (SL 6 cm) mäßig hohe (0.281%), die Juvenilen die geringsten Mengen (0.264%), die Adulten dagegen die höchsten (0.318%) Mengen an AFGP besitzen. Die Konzentrationen des PAGP verhalten sich ähnlich. Auch hier wurden bei den Juvenilen die geringsten Mengen nachgewiesen (0.138%). Die höchsten Konzentrationen konnten bei den Larven festgestellt werden (0.221%). Bei dem AFGP kann man noch zwischen hoch- (AFGP 1-4) und niedermolekularen Molekülen (AFGP 5-8) unterscheiden. Bei den Adulten dominiert der Anteil der hochmolekularen AFGP deutlich, bei den Juvenilen ist die Tendenz abgeschwächt ebenfalls zu erkennen. Bei den Larven dagegen besteht ein leichtes Übergewicht zugunsten der niedermolekularen AFGP.

Diese Ergebnisse fügen sich gut in das Schema des Lebenszyklus: Die Juvenilen, die in dem wärmeren Wasser der Ostwinddrift verbreitet sind, besitzen die geringsten Mengen an AFGP und PAGP. Larven kommen vor allem im oberflächennahen Wasser vor. Die Temperaturen liegen hier nahe dem Gefrierpunkt, es besteht jederzeit die Möglichkeit der Eiskristallbildung. Die Larven schützen sich vor den schädigenden Eiskristallen mit hohen Mengen an PAGP und auch AFGP. Das PAGP ist besonders bei geringen Eisgehalten wirksam, bietet also bei einer eventuellen Neueisbildung einen effektiven Schutz. Ähnliches ist von den niedermolekularen AFGP (5-8) bekannt. Auch sie entfalten ihre maximale Aktivität bei niedrigen Eisgehalten. Die Larven besitzen die höchsten Mengen an AFGP 5-8. Adulte *P. antarcticum* werden vor allem in dem sehr kalten Eisschelfwasser ($< -2^{\circ}\text{C}$) des südöstlichen Weddellmeeres in Tiefen zwischen 300 und 600 m angetroffen. Unter diesen tiefen Temperaturen und dem hohen Druck bilden sich Eiskristalle, die sehr effektiv von den AFGP 1-4 "neutralisiert" werden können. Die Adulten besitzen von diesem AFGP besonders hohe Konzentrationen. In diesen Regionen nahe dem Filchner-Graben wurde auch das Plättcheneis in großen Mengen beobachtet. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß auch bei antarktischen Notothenioiden die Gefrierschutzproteinsynthese durch äußere Faktoren (Temperatur) gesteuert wird. Der Sinn dieser Strategie liegt vermutlich in einer Energieeinsparung.

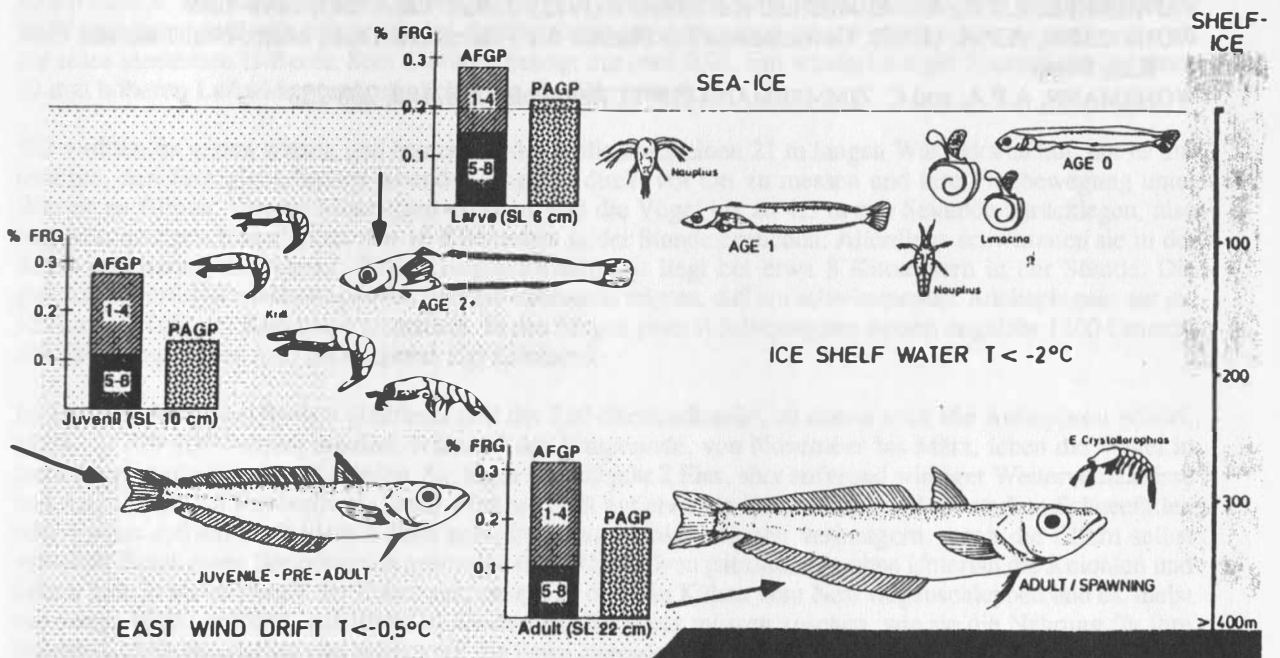


Abbildung 3: Konzentrationen von Gefrierschutzglykoproteinen (% Frischgewicht FRG) bei *Pleuragramma antarcticum* verschiedener Altersklassen. AFGP= Antifreeze Glykoprotein (1-4 hochmolekulare AFGP, 5-8 niedermolekulare AFGP); PAGP= *Pleuragramma*-Antifreeze Glykoprotein. Die Abbildung zum Lebenszyklus von *P. antarcticum* stammt aus Hubold(1985).

Der Besitz von Gefrierschutz(glyko)proteinen in Fischen ist eine wichtige Anpassung, die ein Überleben in Meerwasser nahe dem Gefrierpunkt erlaubt. Mit Ausnahme der antarktischen Zoarciden und Lipariden, welche Proteine synthetisieren (DEVRIES 1988; WÖHRMANN 1992), zeigen die Ergebnisse neuerer Studien von mir an *Pleuragramma antarcticum* und anderen Notothenioiden (ANANTHANARAYANAN 1989; WÖHRMANN 1992) eine hohe Übereinstimmung der Gefrierschutzstrategie: alle Arten besitzen AFGP. Dabei ist *P. antarcticum* ein exzellentes Beispiel für die komplexen Anpassungen, die nötig sind, um im Pelagial des antarktischen Schelfwassers zu überleben. Die Isolierung und Charakterisierung des *Pleuragramma*-Antifreeze Glykoproteins (PAGP) gibt zum erstenmal einen Hinweis auf ein andersartig gebautes Glykoprotein, welches ebenfalls als Gefrierschutz fungieren kann. Sowohl der Gefrierpunktniedrigende Mechanismus ist nennenswert (erinnert an die Hämolymphe von Insekten), als auch die O-glykosidische Bindung des GlcNAc an Serin, welches einen Erstnachweis für die extrazelluläre Existenz bedeutet. Bislang war dieser Bindungstyp nur aus dem Cytoplasma und dem Zellkern bekannt (HART et al. 1989).

Literatur

- ANANTHANARAYANAN, V.S. (1989). *Life Chem. Rep.* 7, 1-32
DEVRIES, A.L. (1988). *Comp. Biochem. Physiol.* 90B, 611-621
EASTMAN, J.T. (1990). In: *Fishes of the Southern Ocean*. GON O & HEEMSTRA PC (eds.), J.L.B. Smith Institute of Ichthyology Grahamstown, 34-52
HANSEN, T.N. and J.G. BAUST (1988). *Biochim. Biophys. Acta* 957, 217-221
HART, G.W., R.S. HALTIWANGER, G.D. HOLT and W.G. KELLY (1989). *Annu. Rev. Biochem.* 58, 841-874
HASCHEMEYER, A.E.V. and H.W. JANNASCH (1983). *Comp. Biochem. Physiol.* 76B, 545-548
HUBOLD, G. (1985). In: *Antarctic nutrient cycles and food webs*. SIEGRIED WR, CONDY PR & LAWS RM (eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 445-451
HUBOLD, G., W. HAGEN, A. KUNZMANN, A.P.A. WÖHRMANN and C.F. VON DORRIEN (1990). *Proc. 2nd Int. Conf. Biol. Antarct. Fishes*, Ravello, 30.5.-1.6.90
VANDENHEEDE, J.R., A.I. AHMED and R.E. FEENEY (1972). *J. Biol. Chem.* 247, 7885-7889
WÖHRMANN, A.P.A. (1992). Gefrierschutz bei Fischen der Polarmeere. Diss., Math.-Nat. Fakultät Univ. Kiel, 94 pp
WÖHRMANN, A.P.A. and C. ZIMMERMANN (1992). *Rep. Polar Res.* 100, 208-223